

아세틸콜린에스테라제의 체내 연구를 위한 방사성추적자: p -[^{18}F]Fluorodonepezil
A Radiotracer for In Vivo Studies of Acetylcholinesterase: p -[^{18}F]Fluorodonepezil

이상윤,^{1,2} 최연성,¹ 최 용,¹ 김상은,¹ 이경한,¹ 이지우,² 김병태¹

¹삼성의료원 핵의학과, ¹삼성생명과학연구소, 서울시 강남구 일원동 50 우)135-710;

²서울대학교 약학대학, 서울시 관악구 신림동 산 56-1 우)151-742

요약

알츠하이머병은 신경계(central nervous system) 아세틸콜린의 부족으로 인하여 생기는 노인성 치매의 일종으로, 여러 아세틸콜린에스테라제(AChE) 억제제를 사용한 AChE의 체내 연구가 활발히 진행되고 있다. 이 연구에서는 FDA의 승인을 받아 치료제로 사용되고 있는 donepezil을 ^{18}F 으로 표지하여 설치류에서 생물학적 가치를 평가하였다. p -[^{18}F]Fluorodonepezil은 마우스에서 비특이적인 생체내 분포를 나타냈으며, 다른 대사 물질로도 변환되지 않았다. 이 연구결과는 AChE를 가시화하기 위해서는 알츠하이머병을 치료할 경우보다 더 낮은 IC_{50} 값을 갖는 방사성추적자의 개발이 무엇보다도 필요하다는 것을 제시해주고 있으며 현재 이러한 연구가 진행 중에 있다.

Abstract

Alzheimer's disease (AD) is one of senile dementia caused by lack of acetylcholine in central nervous system, and in vivo studies of acetylcholinesterase (AChE) have been carried out using many radiolabeled AChE inhibitors (donepezil, tacrine, physostigmine, CP-126,998, etc). Donepezil, a FDA approved drug for AD is now in clinical use. Therefore, we synthesized and evaluated p -[^{18}F]fluorodonepezil in mice. Biodistribution studies demonstrated that p -[^{18}F]fluorodonepezil binds non-specifically in vivo and does not suffer from metabolism in mouse brain. This study suggests that radioligands with higher binding affinity may be required to visualize AChE in vivo and further studies are needed to develop better radiotracers.

1. 서론

신경전달 물질 중 하나인 아세틸콜린의 부족으로 인해 기억상실등의 치명적인 뇌기능 장애를 일으키는 알츠하이머병(Alzheimer's disease)은 흔히 "치매"로 더 잘 알려져 있다. 현재까지 이 질병의 원인은 상당히 많이 밝혀져 있고, 그에 상응하는 치료전략들도 활발히 보고되고 있다. 그 중 가장 많은 연구가 이루어지는 분야가 아세틸콜린의 가수분해 효소인 AChE를 억제하여 콜린의 양을 유지시키는 것이다. 현재 진단은 물리적이고 객관적인 것보다는 문답 형식의 주관적 진단에 치중하고 있기 때문에 조기 발견 및 치료에 어려움을 가지고 있다. 따라서, 효과적이고 정밀한 진단 방법이 요구되는데, 외과 수술을 거치지 않고도 체내의 생화학적, 생리학적 정보를 정밀하게 가시화할 수 있는 PET (Positron Emission Tomography) 및 SPECT (Single Photon Emission Computed Tomography) 등이 그런 목적에 적합하다. 현재까지 많은 AChE 억제제가 개발되었고, 일부는 상용화되었다. FDA의 승인을 받은 치료제로는 donepezil(상품명: AriceptTM)¹과 tacrine(상품명: CognexTM)²이 있으며, 비교적 활성이 좋은 sarin,³ physostigmine,⁴ CP-126,998⁵ 등도 알려져 있다 (Fig. 1). 이러한 물질들은 AChE 억제 효과를 가진다는 공통점을 가지지만 부틸콜린 에스테라제 같은 유사 효소에 대한 선택성이나 부작용 및 물리적, 화학적 성질의 차이로 인해, 본 저자들은 donepezil을 방사성추적자로 개발하고자 하였다.¹ 방사성동위원소로 표지된 donepezil은 donepezil과 생리활성이 다를 수 있기 때문에 많은 donepezil 유도체의 활성(IC₅₀)을 조사한 결과, 가장 유력한 성적을 보인 *p*-[¹⁸F]fluorodonepezil을 합성하기로 하였다. 또한 설취류를 사용한 체내 연구를 통하여 이 방사성추적자의 안정성 여부, 대사 및 생체내 분포도에 대한 연구를 수행하고자 하였다.

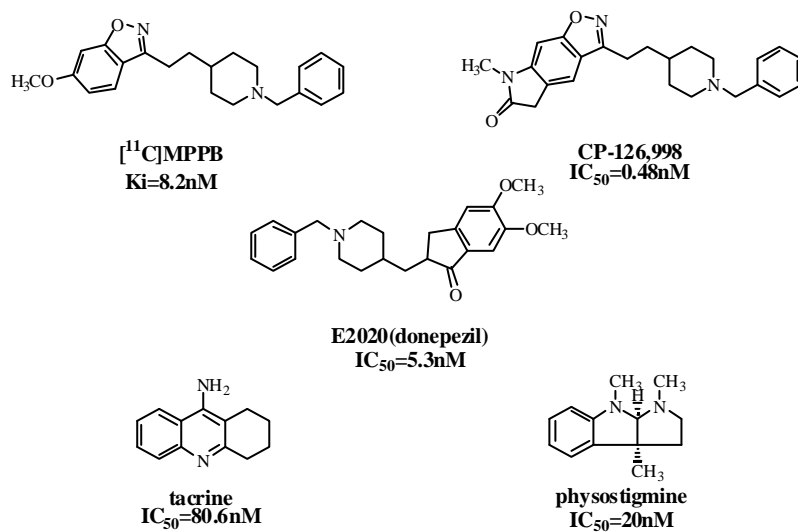


Fig. 1. AChE 억제제들의 구조

2. 실험 및 결과

① 합성

p-[¹⁸F]Fluorodonepezil의 방사화학적 합성은 2와 같은 합성법에 의해 이루어졌다. 먼저 cyclotron에서 생산된 ¹⁸F를 상이동축매화하여 *p*-trimethylammoniumbenzaldehyde triflate와 DMSO에서 90°C로 5분간 반응하면 *p*-[¹⁸F]fluorobenzaldehyde가 높은 수율로 얻어진다. 같은 반응 용기에 piperidine moiety를 넣고 MeOH, NaBH₃CN 및 HOAc와 함께 130°C에서 15분간 반응시켜 reductive amination 반응을 수행하였다. 반응액을 CH₂Cl₂와 H₂O를 사용하여 추출하였고 유기층을 Na₂SO₄로 채워진 유리관에 통과시킨 후에 질소를 이용하여 유기 용액을 농축시킨 뒤, HPLC 컬럼에 주입하였다.

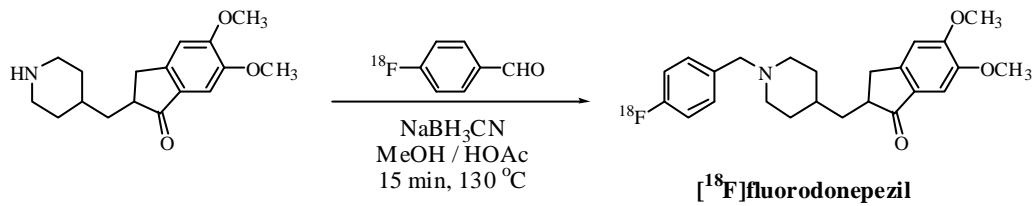


Fig. 2. *p*-[¹⁸F]Fluorodonepezil의 합성경로

HPLC 컬럼은 98:2로 섞인 CH₂Cl₂:CH₃OH (1% NH₄OH) 용매를 사용하여 분당 4 ml의 속도로 유출하였으며 원하는 방사성화합물이 15-17분 사이에서 유출되었다. 방사화학적 순도는 99% 이상, 감쇠보정된 방사화학적 수율은 40-52%이었으며, 유효 비방사능(effective specific activity)은 760-1005 Ci/mmol이었다. 합성과 정제에 소요된 시간은 약 100분이었고, 10%의 에탄올이 포함된 생리식염수에 용해하여 동물실험에 사용하였다. *p*-[¹⁸F]Fluorodonepezil의 동정은 비방사성 동일물질인 *p*-fluorodonepezil과 함께 HPLC에 주입하여 동시에 유출되는 것으로 확인하였다.

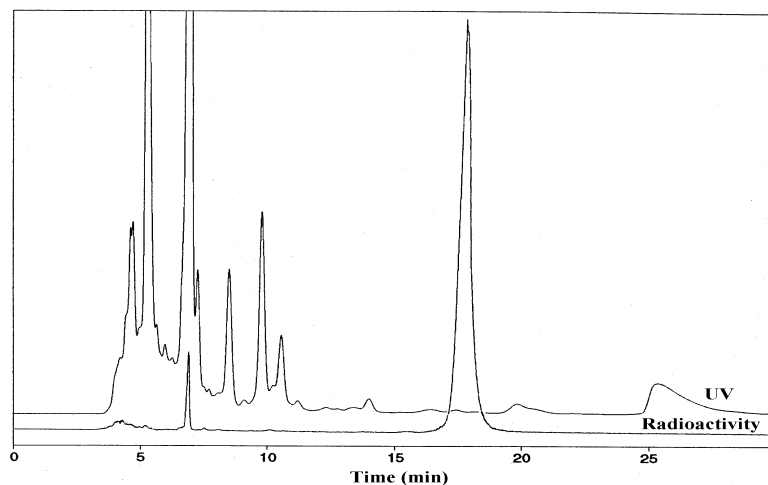


Fig. 3. *p*-[¹⁸F]Fluorodonepezil(t_R =17-18 min)의 HPLC 크로마토그램

② 정상 마우스 뇌에서의 안정성 실험

평균 무게가 30g인 마우스에 합성된 방사성추적자를 투여한 후 2, 5, 15, 30, 60분에 한 마리씩 희생시켜 즉시 뇌를 꺼냈다. 이 뇌에 에탄올을 넣고 homogenize한 뒤, 원심분리하여 얻은 상층을 실리카겔 TLC에 점적하여 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}=10:1$ 의 조건으로 전개하였다. Radio-TLC scanner를 이용하여 분석한 결과, 60분이 지나도 $p\text{-}^{18}\text{F}$ fluorodonepezil만이 남아 있었고 방사성 대사물은 전혀 발견되지 않았다 (Fig. 4). 이 실험과 병행하여 마우스 혈액에서의 안정성을 측정하였다. 우선 2, 15, 60분에서 희생시킨 마우스에서 0.5~2 ml의 피를 뽑은 뒤, 에탄올을 넣고 원심분리하여 앞에서 했던 똑같은 방법과 조건으로 TLC를 확인한 결과, 15분내에 $p\text{-}^{18}\text{F}$ fluorodonepezil의 반이 극성이 큰 대사물질로 전환되어 있었다 (Fig. 5).

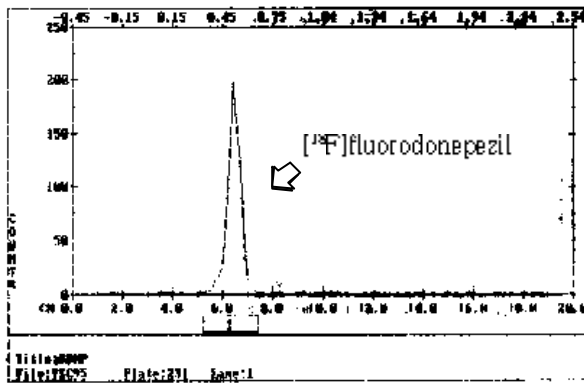


Fig 4. 마우스 뇌에서 얻은 TLC크로마토그램

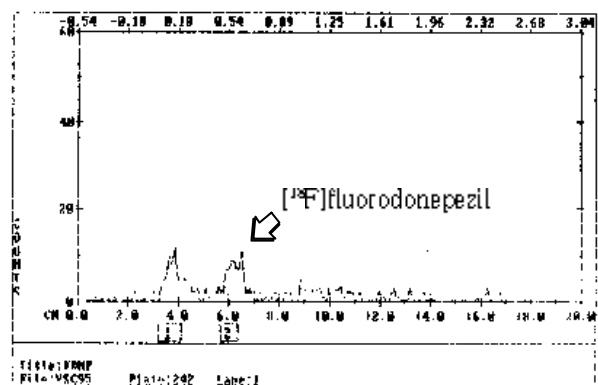


Fig 5. 마우스 혈액에서 얻은 TLC크로마토그램

③ 정상 마우스 뇌에서의 분포도

마우스의 뇌에서는 AChE이 striatum, cortex, cerebellum의 순서로 분포되어있다고 보고되어 있다.⁶ 따라서, AChE를 가시화하기 위해서는 다른 조직에 비해 선택적으로 많은 양의 방사성추적자가 striatum에 분포되어야만 한다. 이 연구에서는 $p\text{-}^{18}\text{F}$ fluorodonepezil을 $\sim 50 \mu\text{Ci}/0.2 \text{ ml}$ 의 농도로 생리식염수(10% 에탄올)에 희석하여 마우스의 꼬리에 정맥주사하고 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120 분에 각 4마리씩 희생하여 뇌를 적출한 후에, 각각 11개의 조직을 얻어 각각의 무게와 radioactivity를 측정(γ -counter), 감쇠 보정하여 %ID/g으로 나타내었다. 마우스에서의 체내 분포도를 보면 $p\text{-}^{18}\text{F}$ fluorodonepezil의 섭취도가 striatum과 cortex에서 다른 조직에 비해 특이성을 보이지 않았다 (Fig. 6). 또한 ^{18}F 이 방사성추적자에서 유리되는지를 확인하기 위하여 뼈에 대한 섭취도를 확인한 결과, 뼈로의 섭취도는 매우 낮았으며 시간에 따른 증가를 보이지 않았다. 뇌에 흡수된 방사성물질의

양은 전체의 1.66%로 높지 않았으며 이 값은 이 화합물의 친지방성성에 기여한 결과라고 볼 수 있다.

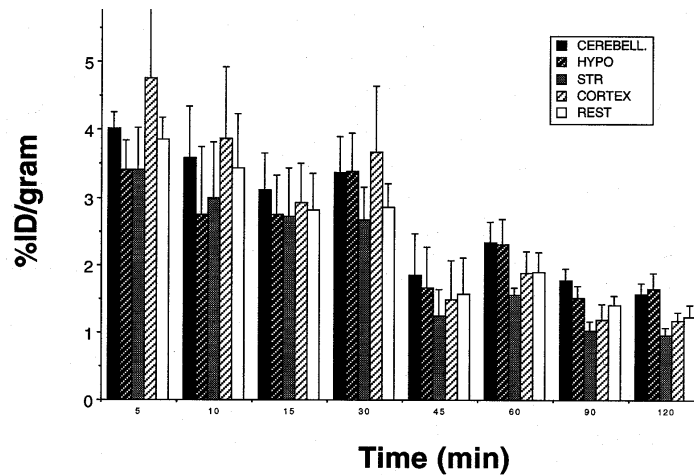


Fig. 6. 마우스 뇌에서의 p -[^{18}F]fluorodonepezil의 분포도

3. 토의 및 고찰

시판중인 donepezil은 알츠하이머병에 대하여 현재까지 가장 좋은 약효를 인정받고 있으며 이번 연구에서 표지된 p -[^{18}F]fluorodonepezil은 donepezil과 비슷한 IC_{50} 값을 가지며, 물리적 또는 화학적 성질도 크게 다르지 않을 것으로 예상되어, 뇌에서 알려진 AChE 분포와 동일한 분포를 가질 것으로 기대되었다. p -[^{18}F]Fluorodonepezil의 마우스에서의 생체내 분포도는 AChE의 알려진 분포도와 일치하지 않았으며 특이성이 발견되지 않았다. 또한 이 방사성추적자는 혈액에서는 50%가 15분내에 극성이 큰 대사물로 전환이 되지만 이 대사물질은 마우스 뇌의 혈뇌장벽을 통과하지 못하는 것이 관찰되었다. 반면에 homogenize된 뇌조직을 분석한 결과, p -[^{18}F]fluorodonepezil은 뇌에서는 매우 안정하여 대사되지 않는 것으로 확인되었다. 이 결과는 IC_{50} 값이 유사한 AChE 억제제인 [^{11}C]MPPB⁶의 결과에서도 살펴볼 수가 있다. 반면에 IC_{50} 값이 0.48 nM인 CP-126,998⁵은 마우스 striatum에로의 섭취도가 cerebellum에 비하여 주사후 30분에 4.3배, 120분에 2.4배에 달하여 매우 유력한 방사성추적자로 개발 중에 있다. 이들 결과에서 유추할 때, AChE를 체내에서 연구하기 위하여는 다른 많은 인자들이 있지만 IC_{50} 값이 sub-nanomolar인 방사성추적자의 개발이 무엇보다도 중요할 것으로 사료된다. AChE의 체내연구를 위한 방사성추적자의 개발이 매우 시급하며 앞으로 많은 연구가 수행되어야 한다.

4. 참고문헌

- 1) Sugimoto H., Tsuchiya Y., Sugumi H., Higrashi K., Karibe N., Imura Y., Sasaki A., Kawakami T., Nakamura T., Araki S., Yamanishi Y., and Yamatsu K. *J. Med. Chem.* **33**: 1880 (1990)
- 2) Tavitian B., Pappata S., Bonnot-Lours S., Prenant C., Jobert A., Crouzel C., and Giamberardino L.D. *Eur. J. Pharmacol.* **236**: 229 (1993)
- 3) Prenant C. and Crouzel C. *J. Labelled Cpd. Radiopharm.* **28**: 645 (1990)
- 4) Bonnot-Lours S., Crouzel C., Prenant C., and Hinnen F. *J. Labelled Cpd. Radiopharm.* **33**: 277 (1993)
- 5) Musachio J.L., Flesher J.E., Scheffel U., Stathis M., Dannals R.F., Ravert H.T. Mathews W.B., Pomper M.G., and Frost J.J. *J. Nucl. Med.* **37**: 41P (1996)
- 6) Clive B.P., Scott E.S., Philip S.S., Sherman, and Michael R. Kilbourn. *Nucl. Med Biol.* **26**:99-103 (1999)